

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: **Takeo TANAAMI et al.**

Serial Number: **Not Yet Assigned**

Filed: **December 9, 2003**

Customer No.: 38834

For: **HYBRIDIZATION METHOD AND HYBRIDIZATION EQUIPMENT**

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119

Commissioner for Patents
P. O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

December 9, 2003

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

Japanese Appln. No. 2002-359034, filed on December 11, 2002

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 50-2866.

Respectfully submitted,
WESTERMAN, HATTORI, DANIELS & ADRIAN, LLP



John P. Kong
Reg. No. 40,054

Atty. Docket No.: 032019
Suite 700
1250 Connecticut Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20036
Tel: (202) 822-1100
Fax: (202) 822-1111
JPK/yap

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年12月11日
Date of Application:

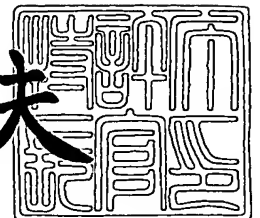
出願番号 特願2002-359034
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-359034]

出願人 横河電機株式会社
Applicant(s):

2003年 8月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3064432

【書類名】 特許願

【整理番号】 02N0039

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12M 1/02

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会
社内

 【氏名】 田名網 健雄

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号 横河電機株式会
社内

 【氏名】 片倉 久雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000006507

 【氏名又は名称】 横河電機株式会社

 【代表者】 内田 勲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005326

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション法およびハイブリダイゼーション用装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

バイオチップ基板上の複数のサイトに固定された生体高分子と前記基板上の流動体中で可動な生体高分子を基板上でハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション法であって、

前記バイオチップ基板面に沿って電場を作用させて、前記可動側の生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させるようにしたハイブリダイゼーション法。

【請求項 2】

前記生体高分子のハイブリダイゼーション中に前記電場の方向を切替えて、前記可動側の生体高分子の移動方向を切替えるようにしたことを特徴とする請求項 1 記載のハイブリダイゼーション法。

【請求項 3】

バイオチップ基板上の複数のサイトに固定された生体高分子と前記基板上の流動体中で可動な生体高分子を基板上でハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション法であって、

前記バイオチップ基板面に沿って、互いに直交する電場と磁場を作用させて、前記可動側の生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させると共にバイオチップ基板面に引き寄せるようにしたハイブリダイゼーション法。

【請求項 4】

前記電場と磁場の方向を共に切替えて、前記生体高分子のハイブリダイゼーション中に前記可動側の生体高分子の移動方向を切替えるようにしたことを特徴とする請求項 3 記載のハイブリダイゼーション法。

【請求項 5】

基板上の複数のサイトに生体高分子を固定してなるバイオチップと、
このバイオチップ基板面に沿って電場を発生させるための正負の電極を備え、

前記電場を作用させて前記バイオチップ基板上の流動体中で可動な生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させるように構成したハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 6】

前記電場の方向を切替えて、前記生体高分子のハイブリダイゼーション中に前記流動体中で可動な生体高分子の移動方向を切替えるように構成したことを特徴とする請求項 5 記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 7】

基板上の複数のサイトに生体高分子を固定してなるバイオチップと、
このバイオチップ基板面に沿って電場を発生させるための正負の電極と、
前記バイオチップ基板面に沿って磁場を発生させるための磁場発生手段
を備え、前記電場と磁場を作用させて前記生体高分子のハイブリダイゼーション中に前記バイオチップ基板上の流動体中で可動な生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させると共にバイオチップ基板面に引き寄せるように構成したハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 8】

前記電場と磁場の方向を切替えて、前記生体高分子のハイブリダイゼーション中に前記可動側の生体高分子の移動方向を切替えるように構成したことを特徴とする請求項 7 記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 9】

前記正負の電極は、前記サイトを挟むように前記基板上に直接または固定用の部材を介して間接的に取りつけたことを特徴とする請求項 5 ないし 8 のいずれかに記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 10】

前記磁場発生手段は、磁石またはコイルを用いたことを特徴とする請求項 7 ないし 9 のいずれかに記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 11】

前記磁場発生手段にコイルを用いた場合に、コイル中に前記バイオチップ基板を配置したことを特徴とする請求項 10 記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 12】

前記電極に電圧を供給する電源として、直流電源または交流電源を使用することを特徴とする請求項5ないし9のいずれかに記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 13】

前記流動体が液体またはゲルであることを特徴とする請求項5ないし12のいずれかに記載のハイブリダイゼーション用装置。

【請求項 14】

前記基板は、板またはワイヤまたはメッシュで形成されたことを特徴とする請求項5ないし13のいずれかに記載のハイブリダイゼーション用装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、DNAや、RNA、DNAに付加したタンパクなどの生体高分子に係るハイブリダイゼーションの高速化、高効率化を実現するためのハイブリダイゼーション法および装置に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

従来より、DNAや、RNA、DNAに付加したタンパクなどの生体高分子（以下DNAを例にとって説明する）の遺伝子配列を測定する際には、ハイブリダイゼーション用のDNAチップが使用される。

ハイブリダイゼーション用のDNAチップとしては、例えば基板上に多数の電極を設け、各電極に電流源を接続した構造のものである。電極数は100～10000程度であり、一般に各電極には既知の異なったDNAが固定される（例えば、非特許文献1参照）。

【0003】

このような既知のDNAが固定された基板上に未知のDNAを流してハイブリダイズさせることにより、対応するDNA配列に未知のDNAを結合させることができる。未知のDNA側に蛍光試薬を結合しておけば、既知のDNAと結合した未知のDNA配列を

知ることができる。

【0004】

以下さらに詳しく説明する。図11(a)に示すように、既知のDNA 82が固定された電極81に正の電圧を印加する。電極81の上の領域には未知のDNA 83が流動できる溶液が含まれている(図示せず)。未知のDNA 83は負に帯電しており、図11(b)に示すように溶液中を移動してDNA 82が固定された電極81に引き寄せられる。これにより電極81の周辺で未知のDNA 83の濃度が上がり、ハイブリダイゼーションが高速になる。

【0005】

また、図12(a)に示すように誤った配列で結合した場合には、その結合が弱いため、ハイブリダイゼーションの後で逆に電極81に弱い負の電圧を印加することにより図12(b)に示すように外すことができる。これによってSNPs(1塩基多型)のような1塩基の違いも高精度で測定することができる。

【0006】

【非特許文献1】

Michael J. Heller, 「An Active Microelectronics Device for Multiplex DNA Analysis」、IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine、1996, March/April、p100-101

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、このような従来の方式では次のような課題がある。

(1) DNAチップの各サイトごとに個別の電極を設ける必要があり、高価であると共に、構造が複雑であって電極のための場所も広くとる必要がある。したがって、サイトの数を増やせず、パターンに自由度がない。

【0008】

(2) 1つのサイトに一度集ると、既知のDNAと異なる配列の余計なDNAでも不完全ながら結合してしまう。例えば、図13に示すように、既知のDNA(A1:図示せず)が固定されたサイトAに未知のDNA(A2)と未知のDNA(B2)が集ったとする。既知のDNA(A1)と未知のDNA(A2)の結合が適切なハイブリダイゼーシ

ョンである場合、サイトAにとって未知のDNA（B2）は余計なものである。

【0009】

他方、既知のDNA（B1：図示せず）が固定されたサイトBに未知のDNA（B2）と未知のDNA（A2）が集ったとする。既知のDNA（B1）と未知のDNA（B2）の結合が適切なハイブリダイゼーションである場合、サイトBにとって未知のDNA（A2）は余計なものである。

【0010】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、簡単な構造で高速のハイブリダイゼーションを行い得る高速・高精度のハイブリダイゼーション法およびハイブリダイゼーション用装置を提供することにある。

また、本発明の他の目的は、各生体高分子が正しいサイトに出会う可能性を向上させ得る、換言すればハイブリダイゼーションの効率の向上が図れるハイブリダイゼーション法およびハイブリダイゼーション用装置を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

このような目的を達成するために、請求項1の発明は、

バイオチップ基板上の複数のサイトに固定された生体高分子と前記基板上の流動体中で可動な生体高分子を基板上でハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション法であって、

前記バイオチップ基板面に沿って電場を作用させて、前記可動側の生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させるようにしたことを特徴とする。

【0012】

これにより、未知の生体高分子を移動・攪拌でき、ハイブリダイゼーションの高速化が容易に実現できる。例えば、正電極側に、負に荷電した浮遊生体高分子が高濃度に集まる。

また、移動により固定側と可動側の生体高分子が出会う確率が向上する。

【0013】

この場合、請求項2のように、電場の方向を切替えて、可動側の生体高分子の移動方向を切替えるようにすることができる。移動方向を切替えることにより、

全サイトにわたって平均して、可動側の生体高分子の高濃度化や出会う確率の向上化を図ることができる。

【0014】

また、請求項3のように、電場と共に磁場も作用させることもできる。磁場を作用させることにより可動側の生体高分子を基板面側に引き寄せることができる。

そして、請求項4のように電場と磁場の方向を共に切替えることもできる。

【0015】

請求項5の発明は、

基板上の複数のサイトに生体高分子を固定してなるバイオチップと、

このバイオチップ基板面に沿って電場を発生させるための正負の電極を備え、前記電場を作用させて前記バイオチップ基板上の流動体中で可動な生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させるように構成したことを特徴とする。

【0016】

この場合も、請求項6のように、電場の方向を切替えて、可動側の生体高分子の移動方向を切替えるように構成することができる。

【0017】

請求項7の発明は、さらに磁場を発生させる磁場発生手段を持ち、電場と磁場を作用させて前記バイオチップ基板上の流動体中で可動な生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させると共にバイオチップ基板面に引き寄せるように構成したことを特徴とする。

この場合、請求項8のように、電場と磁場の方向を切替えて、前記可動側の生体高分子の移動方向を切替えるようにすることもできる。

【0018】

正負の電極は、請求項9のように、前記サイトを挟むように前記基板上に直接または間接的に取りつけることができる。

また、磁場発生手段は、請求項10のように磁石またはコイルを用いることができ、コイルを用いた場合は、請求項11のようにコイル中に前記バイオチップ基板を配置する。

【0019】

また、前記電極に電圧を供給する電源には、請求項12のように直流電源のみならず、交流電源も使用することができる。

また、請求項13のように前記流動体として液体またはゲルが使用できる。

また、基板としては、請求項14のように板またはワイヤまたはメッシュで形成されたものを使用することができる。

【0020】**【発明の実施の形態】**

以下図面を用いて本発明を詳しく説明する。図1は本発明に係るハイブリダイゼーション用装置の一実施例を示す構成図である。図において、1は基板、2は基板1上の複数のサイトに固定されたサンプル（固定側の生体高分子）である。3aと3bは基板1に取り付けられた電極、4aと4bは磁場を発生する手段としての磁石、5は電極3a、3bに直流電圧を加えるための電源である。なお、電極3aと3bはサイトを挟むサイトの両脇の位置に固定されている。そして、サンプル2は、この電極上には固定されず、電極3aと3bに挟まれるサイト上に固定されている。

【0021】

基板1上の領域には、流体系、例えば溶液やゲルなどの流動体を溜めておくための構造が採用されている（図示せず）。そしてこの流動体中には、流動体中で可動な生体高分子（可動側の生体高分子）21が含まれている。

なお、固定側の生体高分子2と可動側の生体高分子21は、いずれか一方が既知、他方が未知の生体高分子であり、またいずれか一方をプローブ生体高分子、他方をターゲット生体高分子とすることもできる。

なお、本実施例では固定側の生体高分子2が既知のプローブDNA2、可動側の生体高分子が未知のターゲットDNA21である場合を例にとって説明する。

【0022】

磁石4aと4bは、図2の（a）に示すようにサイトの両脇にN極とS極が対向するように配置される。電極3a、3bは図2の（b）に示すようにサイトの両脇に配置される。そして、磁石4aと4bにより生ずる磁場（磁界とも言う）

の方向と電極 3 a と 3 b により発生する電場（電界とも言う）の方向とは直交する。

【0023】

このような構成において、基板 1 上の領域にターゲット DNA 2 1 の混入した溶液を満たす。負に荷電したターゲット DNA は溶液中を移動して図 3 に示すように正（+）の電極側 3 a に引き寄せられる。この力を F_1 とする。このとき、フレミング左手の法則に基き、電流（負に荷電したターゲット DNA の移動はその逆方向に電流が流れたことに等価である）と直角方向に加えられている磁場 B（紙面の表側から裏側へ向く方向の磁場）により、ターゲット DNA 2 1 は図 3 に示すように紙面の下方に向う力 F_2 を受ける。

【0024】

これによって、溶液中のターゲット DNA 2 1 はサイト側に引き寄せられ、サイト近傍ではターゲット DNA が高濃度になる。例えば、引き寄せられる前の元の高さ $20\ \mu\text{m}$ から $20\ \text{nm}$ に引き寄せられると、1000 倍圧縮され、DNA の混入濃度も 1000 倍に高濃度となる。

【0025】

なお、そのままの状態にしておくとターゲット DNA 2 1 は正電極側に片寄ってしまうため、途中で電場と磁場の両方を同期して反転させ（反転させる機構は周知のものが使用できる）再びターゲット DNA 2 1 をサイト上で逆方向に移動させる。これにより、各サイトにわたっての高濃度化が実現できる。

【0026】

なお、本発明は上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。以下列挙する。

【0027】

（1）実施例ではサンプルとして DNA を例にとって説明したが、本発明は DNA や RNA、DNA に付加したタンパクなどの生体高分子に広く適用できる。

（2）例えば、電極の形状（平面形状）は直線状でなく図 4 に示すようにサイトに対して反り返る弓状の電極形状 3 1 a, 3 1 b としても構わない。また、図 5 に示すように、一方の電極 3 2 a は直線状の共通電極、他方の電極 3 2 b は各サ

イトごとの個別電極でも差支えない。個別電極の平面形状は、円形、楕円、四角形など各種の形状を取り得る。

【0028】

また、図6に示すように、櫛歯状にして、各櫛歯の間にサイトが配置されるようにしてもよい。

また、電極は、サイト側の断面形状が、図7に示すように三角状、あるいは図8に示すように鋸歯状であっても構わない。

なお、図4～図8に示す電源50は交流電源であり、所定の周期の交番電界を発生する。もちろん、電源50は直流電源としても差支えない。

【0029】

また、磁場は磁石に代えてコイルで発生してもよい。図9は、コイル61中にDNAチップを配置し、交流電源60でコイル61を駆動してDNAチップに交番磁界を与えるようにした構成例である。

以上の図4～図9において、磁場と電場の交番周期を同期させておけば、上記実施例で説明したようにターゲットDNAを基板上で逆方向へ交互に移動させることができる。なお、永久磁石でこのような磁場の逆転を実現するには、モータなどを用いて機械的に磁石の位置を変化させればよい。

【0030】

(3) 電極は、図10に示すように保持のための部材(図示せず)を用いて基板1と分離してもよい。電極36aと36bを絶縁体70(ターゲットDNA混入溶液を溜める容器の蓋を兼ねたカバーガラスなど)に取付けて、上記実施例と同様に電場を発生させるようにしてもよい。

【0031】

(4) 磁場はなくても電場のみでもよい。ターゲットDNAを電極側に引き寄せ、攪拌が可能である。したがって、ある程度的高速ハイブリダイゼーションが可能になる。

(5) いずれの実施例においても溶液をゲルにすると、ターゲットDNAの移動速度を落すことができる。

【0032】

(6) 電極には、金属でもカーボンのような無機系の材料でも使用できる。

(7) 電圧は、電気分解による気泡の発生しない値、例えば 1.3 V 以下が望ましい。

(8) 基板 1 は板でなくワイヤやメッシュなどでも構わない。

【0033】

【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) プローブDNA近傍のターゲットDNAの分布が高濃度になるため、ハイブリダイゼーションが高速化できる。

(2) 電場と磁場の与え方によりハイブリダイズしたDNAを引き剥がす力も発生させ得るので、電場と磁場の発生条件を適切に設定することにより、SNPs のような微妙なミスハイブリダイゼーションを剥すことができる。

【0034】

(3) 電極は、従来のようにサイトの位置ではなく、サイトを挟むようにサイトの両側に配置されているため、ターゲットDNAが特定のサイトのプローブDNAに片寄って吸着することはない。ターゲットDNAを全サイトにわたってサイト配列方向に均一的に移動させることができ、また無駄な吸着も生じない。

(4) サイト数が多くても電極は少なくて済む（少なくとも 2 つの電極でよい）ため、安価、コンパクト、簡単な構造であり、高信頼性が保証される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係るハイブリダイゼーション用装置の一実施例を示す構成図である。

【図 2】

磁石と電極の配置を示す図である。

【図 3】

ターゲットDNAに働く力の説明図である。

【図 4】

電極の他の実施例を示す説明図である。

【図 5】

電極のさらに他の実施例を示す説明図である。

【図 6】

電極のさらに他の実施例を示す説明図である。

【図 7】

電極のさらに他の実施例を示す説明図である。

【図 8】

電極のさらに他の実施例を示す説明図である。

【図 9】

磁場の与え方の他の実施例図である。

【図 1 0】

電極部分の他の実施例図である。

【図 1 1】

従来のハイブリダイゼーション用のDNAチップの一例を示す説明図である。

【図 1 2】

従来のDNAチップにおける電極印加電圧の切替えの様子を説明する説明図である。

【図 1 3】

不完全結合を説明する図である。

【符号の説明】

- 1 基板
- 2 サンプル
- 2 a サイト
- 3 a, 3 b 電極
- 4 a, 4 b 磁石
- 5, 5 0, 6 0 電源
- 2 1 ターゲットDNA
- 3 1 a, 3 1 b 電極
- 3 2 a, 3 2 b 電極
- 3 3 a, 3 3 b 電極

34 a, 34 b 電極

35 a, 35 b 電極

36 a, 36 b 電極

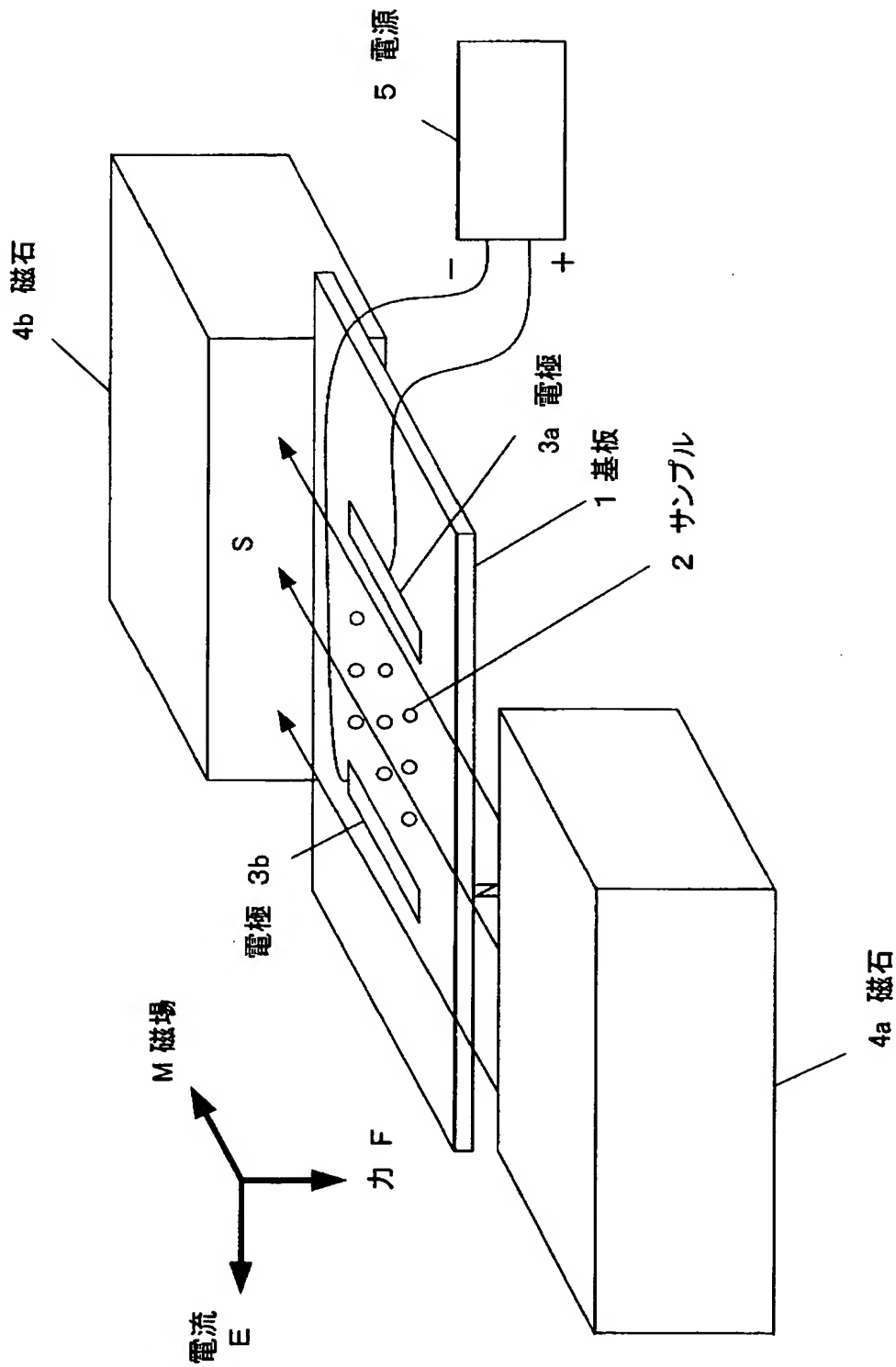
61 コイル

70 絶縁体

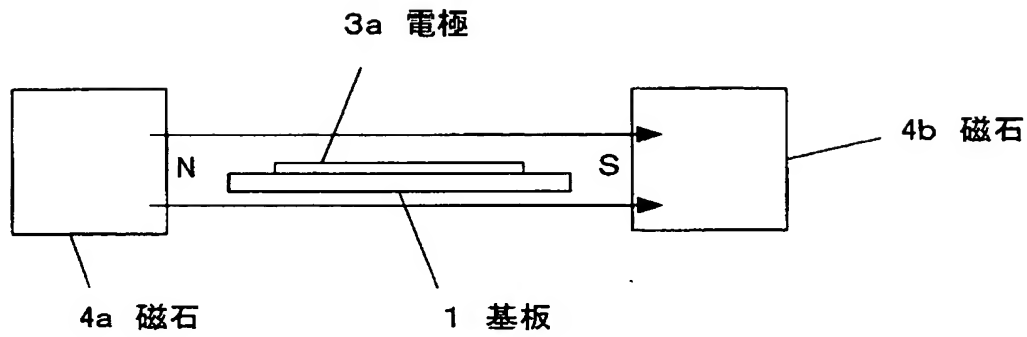
【書類名】

図面

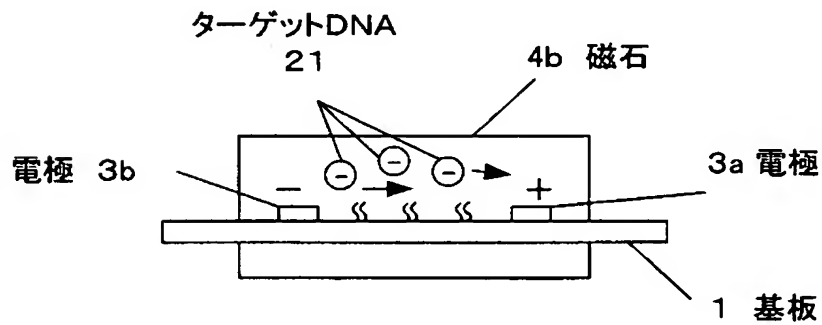
【図 1】



【図 2】

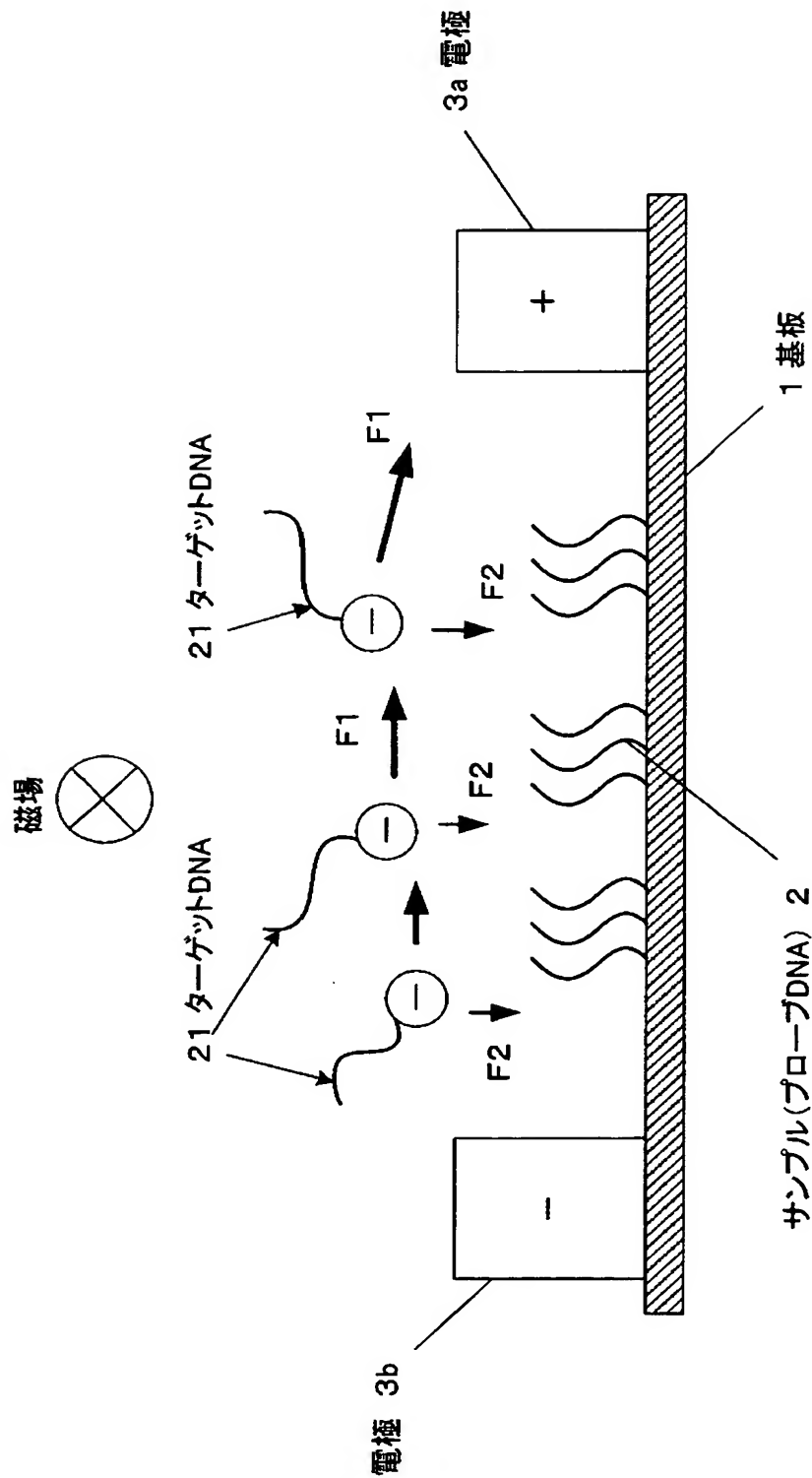


(a) 側面図

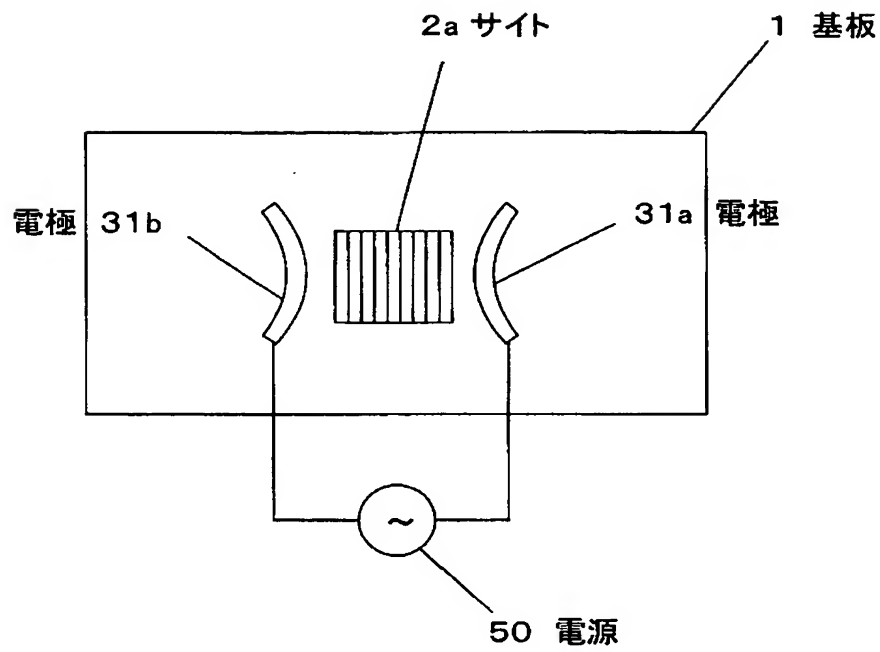


(b) 正面図

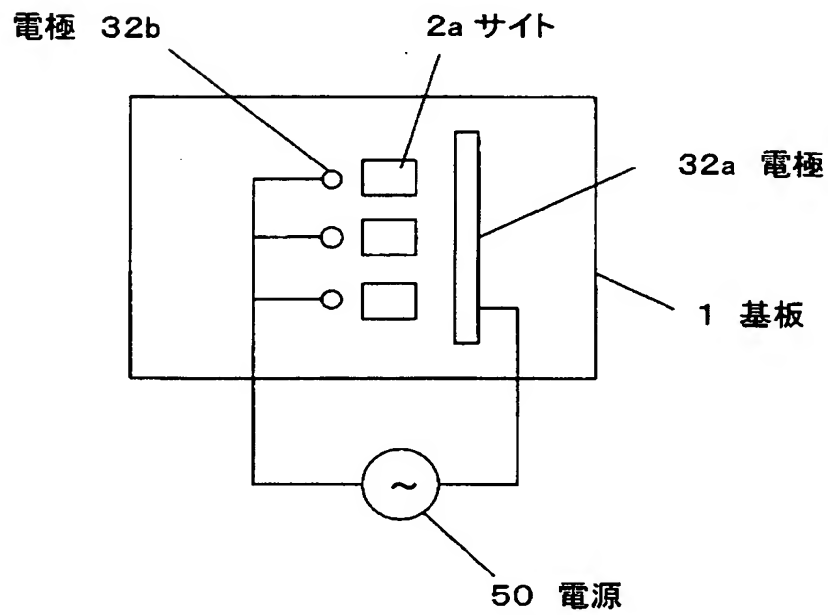
【図 3】



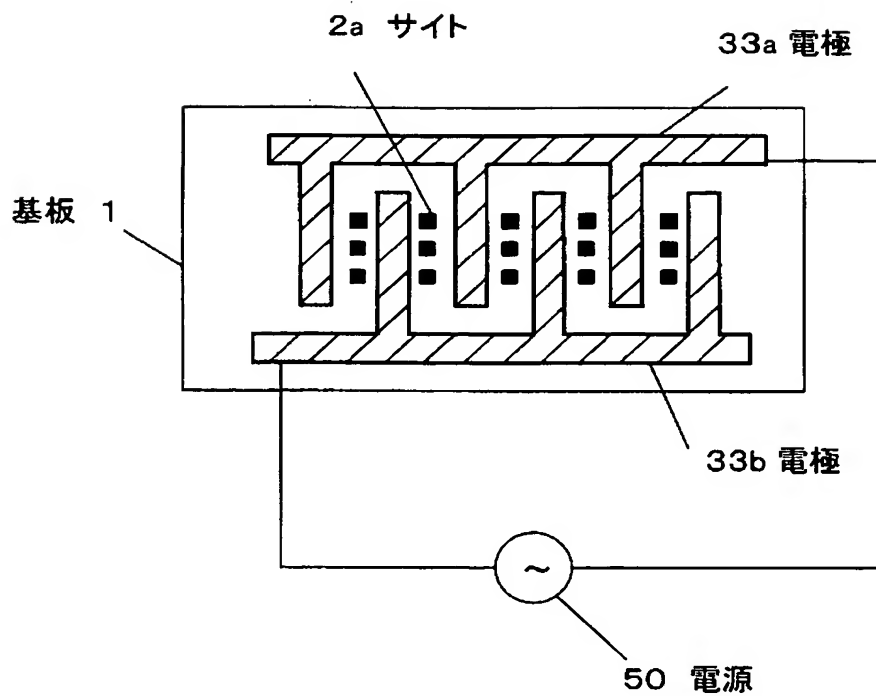
【図 4】



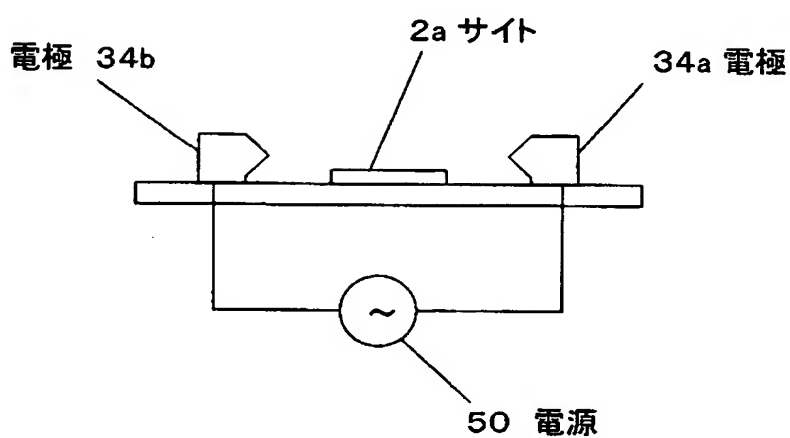
【図 5】



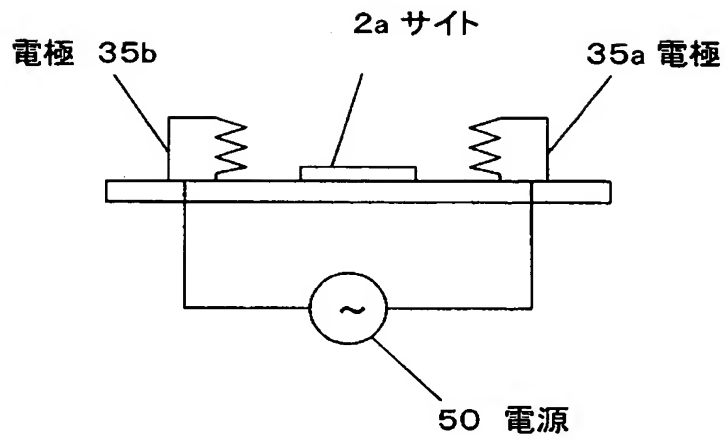
【図 6】



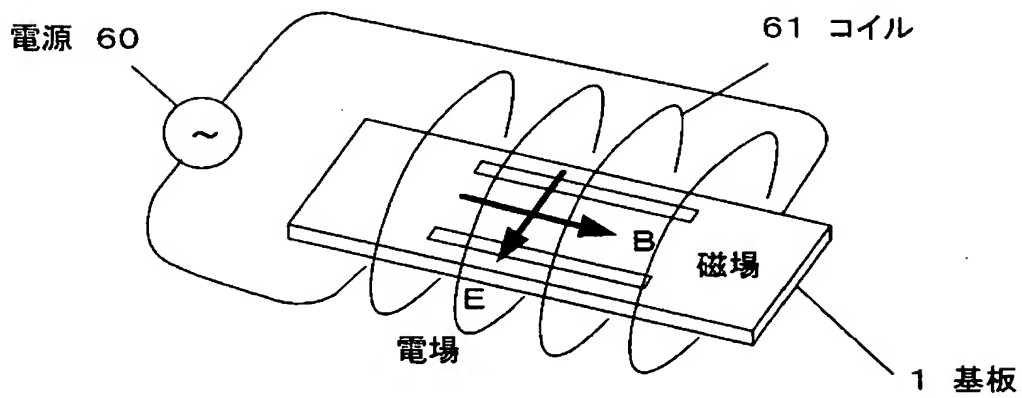
【図 7】



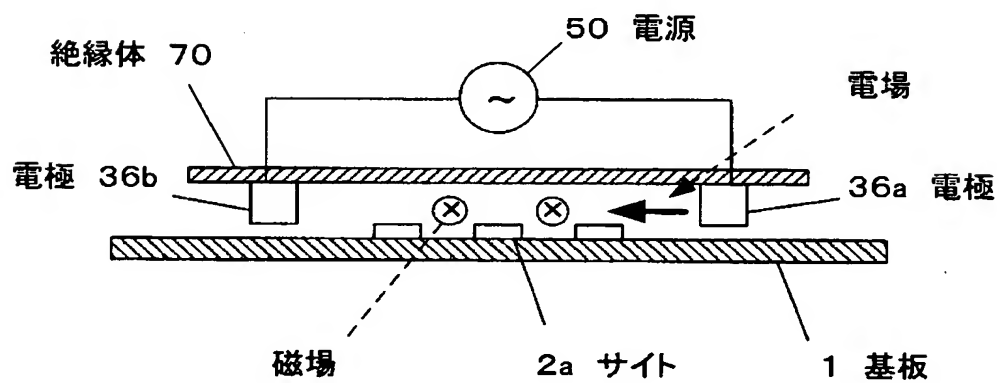
【図 8】



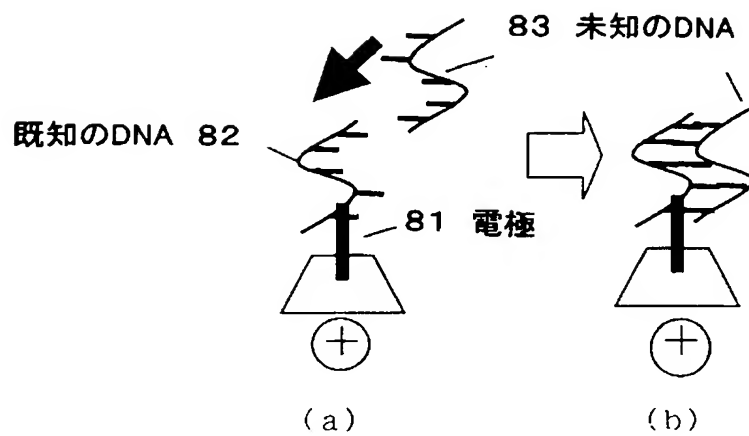
【図 9】



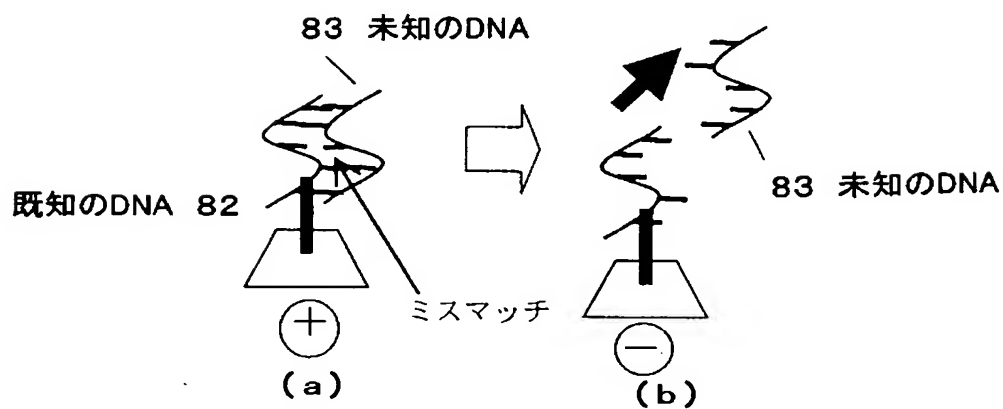
【図 10】



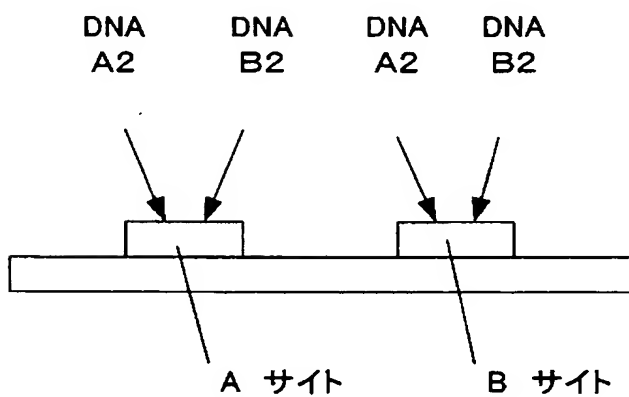
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡単な構造で高速のハイブリダイゼーションを行い得る高速・高精度のハイブリダイゼーション法およびハイブリダイゼーション用装置を提供する。

【解決手段】 基板上の複数のサイトに生体高分子を固定してなるバイオチップと、
このバイオチップ基板面に沿って電場を発生させるための正負の電極と、
前記バイオチップ基板面に沿って磁場を発生させるための磁場発生手段を備え、前記電場と磁場を作用させて前記生体高分子のハイブリダイゼーション中に前記バイオチップ基板面上の流動体中で可動な生体高分子をバイオチップ基板面に沿って移動させると共にバイオチップ基板面に引き寄せるように構成する。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 3 5 9 0 3 4
受付番号	5 0 2 0 1 8 7 3 9 9 1
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 4 年 1 2 月 1 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成14年12月11日

次頁無

特願 2 0 0 2 - 3 5 9 0 3 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 5 0 7]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号

氏 名

横河電機株式会社